

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
HUMANER UND BOVINER SERUMEIWEISSFRAKTIONEN
AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VITRO

Günter / Pohle

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
ISOTOPENLABOR

Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
HUMANER UND BOVINER SERUMEIWEISSFRAKTIONEN
AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Pohle
aus Düsseldorf

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.1966

MEINEN ELTERN GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0166

EINLEITUNG

Da in schweren Stadien einer Krankheit (z.B. schwere Entgleisung eines Diabetes, Malignom u.a.) oder im Hungerzustand der gesamte Stoffwechsel in Mitleidenschaft gezogen ist und als Ausdruck dessen im Serum eine quantitative Veränderung besonders der α - und β -Globuline auffällt, so soll einleitend einer allgemeinen und speziellen Eiweissbetrachtung eine kurze Darstellung des Gesamtstoffwechsels vorangestellt werden.

WECHSELBEZIEHUNGEN IM KOHLENHYDRAT-, FETT- UND EIWEISSSTOFFWECHSEL

Die für die Lebensvorgänge notwendige Energie gewinnt der Organismus unter physiologischen Bedingungen vorwiegend durch den intrazellulären Umsatz von Glukose, in geringem Umfang durch den Abbau von Fett. Glukose und Fett stammen aus der Nahrung oder den Glykogen- und Fettdepots des Körpers. Die Glykogensynthese erfolgt in mehreren enzymatisch gesteuerten Reaktionsschritten, die zum Teil nicht reversibel sind. Der Abbau zu Glukose verläuft daher teilweise über andere Reaktionsstufen. Im Intermediär-Stoffwechsel liegt Glukose stets an Phosphorsäure gebunden vor. Der Abbau von Glukose-6-Phosphat erfolgt entweder über die Glykolyse-Kette (Emden, Meyerhof) zum Zitronensäurezyklus oder im sogenannten Pentose-Phosphat-Zyklus (Horecker, Dickens). Im Verlauf des anaeroben glykolytischen Abbauweges wird das Glukosemolekül in zwei Bruchstücke gespalten. Das eine dieser Spaltprodukte, Dioxiazeton-Phosphat, ist die Ausgangssubstanz für die Glyzerin-Synthese. Hier findet sich bereits eine Verknüpfung von Glukose- und Fettstoffwechsel, da Glyzerin für den Fettaufbau notwendig ist. Das andere Spaltprodukt, Glyzerin-Aldehydphosphat, wird zu Brenztraubensäure und dann oxydativ weiter zu Essigsäure umgewandelt. Essigsäure liegt intermediär an Coenzym-A gebunden vor und wird als aktivierte Essigsäure oder Azetyl-Coenzym-A bezeichnet. Dieses ist aber nicht nur ein Zwischenprodukt des Glukoseabbaues, sondern auch ein Abbauprodukt der Fette und mancher Aminosäuren. Da die Reaktionen des intermediären Stoffwechsels

in der Regel umkehrbar sind, ist es zugleich das gemeinsame Ausgangsprodukt für die Synthese von Glukose und Fett. Die Synthese der Fettsäuren, die von der aktivierten Essigsäure ihren Ausgang nimmt, ist allerdings nicht eine einfache Umkehrung des Abbauweges (1). Vielmehr entsteht zunächst Malonyl-Co-A, in dem an Azetyl-Co-A CO_2 unter der Wirkung eines spezifischen Enzyms in Gegenwart von ATP angelagert wird. Der Aufbau geht weiter zu den beta-Ketosäuren und zu den gesättigten Fettsäuren. Bei der Reduktion der ungesättigten Fettsäuren ist der Wasserstoffdonator das TPN-H, ein Coenzym, welches beim oxydativen Glukoseabbau im Pentosephosphat-Zyklus entsteht - auch hier also eine wichtige Verbindung zwischen Glukose-, Fett- und Eiweiss-Stoffwechsel. Im übrigen erfolgt der weitere Fettsäureaufbau als Umkehrung der beta-Oxydation (2). In vitro gelingt die Synthese höherer Fettsäuren aus Acetat mit einem Fermentsystem (bei unseren Versuchen aus Taubenlebern bereitet) und einige Co-faktoren, wie ATP, DPN-H, TPN-H, Co A, Mg^{++} und Bicarbonat (3, 4).

Schon die praktische Erfahrung lehrt, dass beispielsweise bei der Schweinemast mit Kartoffeln Kohlenhydrate in Fette umgewandelt werden. Es wurde bereits erwähnt, dass die zum Fettaufbau notwendigen Substanzen wie Glycerin und die aktivierte Essigsäure beim Kohlenhydratstoffwechsel entstehen. Bei Glykogenmangel können umgekehrt Fette in Kohlenhydrate umgewandelt werden. Da sowohl beim Fettabbau wie bei der Fettsynthese reichlich Energie, welche vorwiegend dem Kohlenhydratstoffwechsel entnommen wird, benötigt wird, so muss sich dies zwangsläufig beim Diabetes und ebenso im Hungerzustand (mangelnde Verwertung, Substratmangel) auf den Fettstoffwechsel nachteilig auswirken. Die Möglichkeit zur Endoxydation und zur Fettsynthese ist nicht mehr gegeben. Die Acetessigsäure wird jetzt zu Aceton dekarboxyliert, was mit den übrigen Ketonkörpern zu Acidosis führt.

Der Eiweissstoffwechsel ist mit dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel dadurch verbunden, dass der Abbauweg einiger Aminosäuren in die Brenztraubensäure oder in Substanzen des Zitronensäurezyklus einmündet (5).

Die auf diesem Wege mögliche Gluconeogenie tritt beim Diabetes besonders in Erscheinung. Die Umwandlung von Kohlenhydrat in Eiweiss ist ebenfalls möglich, worauf bei der Besprechung der Serumproteinsynthese noch eingegangen wird.

Eine wichtige Stoffklasse, die Fermente, muss hier noch besonders erwähnt werden, da sie -selber Proteine bzw. Proteide- auch unter den verschiedensten Serumproteinfraktionen auftretend überall vorkommen und sämtliche Reaktionen im Organismus beeinflussen, sei es, dass sie hemmend oder fördernd, aufbauend oder abbauend eingreifen. Diese wichtigen Wirkstoffe steuern die chemischen Reaktionen, welche sie auslösen, in sinnvoller Weise.

DIE SERUM-PROTEINE

1. Ihre Entstehung

Die Serumproteine werden intrazellulär in der Leber und im RES nach einem vererbten Strukturmuster gebildet, wobei die Träger der Erbeigenschaften die Chromosomen des Kernes sind. Die Chromosomen enthalten Proteine und Desoxyribonukleinsäuren. Es gilt heute als gesichert, dass in den DNS-Anteilen der Chromosomen die Informationen verankert sind, welche die Strukturspezifität der Proteine bestimmen. Die Ribonukleinsäuren des Plasma sind unmittelbar an der Biosynthese beteiligt und enthalten wahrscheinlich die Matrizen, die die Proteinstrukturen durch Anbau der Aminosäuren an entsprechender Stelle bestimmen. Die Proteinsynthese als wichtiger Energie verbrauchender Prozess benötigt reichlich ATP. Die für die Proteinsynthese notwendigen Aminosäuren stammen zum Teil aus dem Abbau der Nahrungsproteine -unter ihnen die essentiellen Aminosäuren- zum anderen Teil resultieren Aminosäuren aus der endogenen Aminosäuresynthese, die vor allem durch Übertragung von Aminogruppen (Transaminierung) auf geeignete alpha-Ketosäuren ermöglicht wird. Andererseits können Aminosäuren durch oxydative Desaminierung zu alpha-Ketosäure umgesetzt werden, welche entweder unter Energiegewinnung zu H_2O und CO_2 abgebaut oder zur Glukoneogenese verwendet werden können (6).

2. Chemische Struktur und Architektonik

Die Serumproteine sind, wie alle Proteine, aus einer oder mehreren Polypeptid-Ketten aufgebaut. Die Polypeptide ihrerseits sind grosse kettenförmige Komplexe, die aus Aminosäuren säureamidartig unter Wasserabspaltung verknüpft sind. Tritt zu den Proteinen noch eine Nichteisweisgruppe, eine prosthetische Gruppe, hinzu, dann spricht man von Proteiden. Die meisten Serumproteine enthalten einen Kohlenhydratanteil und sind deshalb als Glykoproteide zu bezeichnen, aber auch Lipo-, Metall- und andere Proteide werden gefunden. Die chemische Struktur der Proteine allein gibt jedoch noch keine genügende Auskunft über die eigentliche Feinstruktur, die räumliche Anordnung bzw. die daraus folgende Form. Sagt also die Primärstruktur nur etwas über die Zahl, Art und Sequenz der chemisch aneinander gekoppelten Aminosäuren aus, so gibt die Sekundär- und Tertiärstruktur auch Aufschluss über die Architektonik.

Die Primärstruktur der wichtigsten Serumproteine ist heute zum grössten Teil aufgeklärt. Da an dem einen Ende einer Polypeptidkette stets eine Aminosäure mit freier NH_2 -Gruppe und an dem anderen Ende eine freie $COOH$ -Gruppe vorhanden ist, lassen sich aus der Zahl der freien bzw. gebundenen endständigen Aminosäureradikalen wichtige Schlüsse ziehen. Die vergleichende Analyse von

Serumalbuminen verschiedener Säuger weist - als endständige freie NH_2 tragende Gruppe Asparaginsäure bei Mensch und Tier auf, während als endständige Aminosäure mit freier COOH -Gruppe beim Menschen Leucin und bei den untersuchten Tieren Alanin gefunden wurde. Hier scheint also schon in der Primärstruktur eine Art-Spezifität zu liegen (7).

Über die Primärstruktur der Serumalbumine von Mensch und Rind gibt am besten die Tabelle 1 Auskunft:

TABELLE 1

Aminosäurebausteine des Serumalbumins von Mensch und Rind
aus Wuhrmann/Wunderly, Die Bluteiweisskörper des Menschen (1952)

Serumalbuminzusammensetzung (aus Brand, Kassel und Seidel: J. clin. Invest. (Am.) 23, 437 (1944))	Mensch	Rind
Angenommenes Molekulargewicht	70 000	70 000
Molekulargewicht eines durchschnittlichen Bausteines	113, 3	112, 5
Approximative Zahl der Aminosäuren pro Molekül	618	620
Approximative Zahl der basischen Gruppen pro Molekül	105	111
Schwefelatome in-S-S-Bindungen pro Molekül	32	32
Zahl der Aminosäurebausteine pro Molekül:		
Arginin	25	25
Lysin	28	30
Methionin	6	4
Tryptophan	0, 6	2
Tyrosin	18	21
Threonin	30	38
Leucin	64	73

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Tryptophan-Lysin-Threonin- und Leucin-gehalt beim Rind höher ist als beim Menschen. Es finden sich also außer der bereits erwähnten unterschiedlichen Sequenz der Aminosäuren auch quantitative Unterschiede in der Primärstruktur der Proteine bei Mensch und Rind.

Zu der Entdeckung der Sekundär-Struktur gelangt man erst durch die Entdeckung von Pauling, welcher eine H-Brückenbindung innerhalb der Peptid-

kette nachweisen konnte. Dies, sowie das Wissen über Atomdistanzen und Bindungswinkel führten zur Alpha-helixstruktur, einem 3-dimensionalen Gebilde (8).

Da die Albumin und Globulinmoleküle einen Durchmesser von nur 30 - 50 Å haben, mußte angenommen werden, daß die Alpha-Helix-Spirale gefaltet sein muß, was durch Röntgenanalysen bestätigt werden konnte und zu einer Vorstellung von der Tertiärstruktur führte (9).

3.) Eigenschaften

Die Proteine sind als hochmolekulare Stoffe Kolloide; als solche können sie durch tierische Membranen nicht hindurch diffundieren: sie sind nicht dialysierbar.

Als kolloidgelöste Teilchen umgeben sich die Eiweißstoffe mit einer Wasserhülle. Diese Hydratation hängt hauptsächlich ab von der elektrischen Ladung der Eiweißkörper, welche als Ionen auftreten. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Eiweißion und Wassermolekül ist bei den Albuminen wesentlich größer als bei den Globulinen, da erstere mehrere Ionen besitzen. Die Kraft, mit der das Wasser an das Kolloid gebunden ist, wird als kolloid-osmotischer Druck bezeichnet. Auf ihrer besonderen chemischen Struktur und ihr Auftreten als Ionen besteht auch eine wichtige Eigenschaft der Proteine, nämlich ihre Ampholytnatur und die damit verbundene Pufferwirkung. Als Träger der elektrischen Ladung eines Proteinmoleküls sind die ionisierten Amino- und Carboxylgruppen der Seitenketten und die endständigen Aminosäureradikale der Polypeptide anzusehen, welche auch den hydrophilen und lipophilen Charakter bestimmen, so also auch über ihre Löslichkeit im Plasma entscheiden. Infolge der unterschiedlichen elektrischen Ladung der einzelnen Eiweißteilchen ist auch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld eine verschiedene, eine Eigenschaft, die man sich bei der Elektrophorese zur Trennung der Serumproteine in Wissenschaft und Klinik nutzbar gemacht hat. Eine weitere heute in der Forschung viel benutzte Trennungsmethode ist die Ultrazentrifuge (nach Svedberg), bei der einer bestimmten Teilchengröße bzw. Molekulargewicht der Proteine eine konstante Sedimentationsgeschwindigkeit entspricht. Aus den vielfältigen Eigenschaften erklären sich die mannigfaltigen Aufgaben.

4.) Funktionen der Serumproteine

Nur in ihrem normalen Milieu (das ist Serum in vivo), in dem allein die Sekundär- und Tertiärstruktur erhalten ist, können die Proteine ihre volle Funktion entfalten. So ändert sich bei Denaturierung von Fermenteiweiß sofort deren Fermentwirkung, ohne daß die chemische Grundstruktur verändert worden ist. Es sind also wesentliche Eigenschaften, Reaktionen und spezifische Wirkungen der Serumproteine an die Architektonik, eben die Sekundär- und Tertiärstruktur, gebunden. Die einzelnen Serumproteinfraktionen haben nicht nur eigene ihrer ganz bestimmten Struktur und Form zukommende Funktionen, sondern sie haben auch in ihrer Gesamtheit eine Ganzheitsleistung zu erfüllen. Eine solche biologische Einheit der Serumproteine ist die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes, die Viskosität, die Konstanterhaltung der H-Ionenkonzentration (Pufferwirkung) und die Vehikelfunktion, welche letztere allerdings für bestimmte Substanzen von bestimmten Serumproteinfraktionen (z. B. Lipoproteine für Fette) übernommen wird. Schließlich dienen die Serumproteine auch noch als Eiweißquelle.

ALBUMINE

Die Albumine haben den Hauptanteil an der Vehikelfunktion besonders für Wasser; deswegen sind sie auch für fast 75 % des kolloidosmotischen Plasmadruckes verantwortlich. Wegen des hohen Gehaltes an basischen Aminosäuren ist das Bindungsvermögen für Anionen entsprechend hoch. Auch scheinen die freien Fettsäuren vorwiegend von den Albuminen transportiert zu werden (10).

GLOBULINE

Die Globuline gliedern sich in viele Unterfraktionen auf, wie es die Tabelle 2 deutlich zeigt:

TABELLE 2

Chemische Zusammensetzung definierter Humanplasmaproteine (modifiziert nach SCHULTZE und HEIDE (267) sowie WINZLER (324))
aus Wuhrmann/Märki, 1963

	Stickstoff %	Biuretwert bezogen auf Albumin 5500 A	Hexosen (Galaktose; Mannose) %	Fukose %	Acetyl- hexo- amin %	Acetyl- neuro- amin- säure %	Lipide %	Autoren
Tryptophanreiches								
Präalbumin		96	1,1 (1:1)	0	0,19	0		267
Albumin	16,0	100	0,05	0	0,03	0	0,2	267
-Serumcoid	10,1	62	14,7 (2:1)	0,70	13,9	12,1		267
-Glykoprotein (3, 5 S)	13,3	84	6,8		3,6 ⁺	3,3		260
-Lipoprotein (D = 1, 063-1, 20)		44	0,9	0,05	0,25	0,3	53	33
Coeruloplasmin	14,4	89	3,0 (2:1)	0,18	2,4	2,4	0	267
-Makroglobulin	14,8	92	3,6 (1:1)	0,12	2,9	1,8	0	267
-Glykoprotein	12,6	80	5,0 (1:1)		3,5 ⁺	7,0		256
-Lipoprotein (D 1, 019)		8	1,2	0,08	0,2	0,2	91,9	33
Haptoglobin 1-1		81	7,8 (2:1)	0,20	5,3	5,3		267
2-1			6,3 (2:1)	0,18	5,9	3,9		269
2-2			5,4 (2:1)	0,18	5,5	3,4		269
-Lipoprotein (= 1, 019-1, 063)		16,5	1,1					
Transferrin	15,4	95	2,4 (2:1)	0,07	0,4	0,3	79,5	33
Fibrinogen (Rind)	15,2	92	1,0 (1:2)	0	2,0	1,4	0	267
Fibrinogen (Mensch)	16,7		3,2 (1:1)	0	0,9	0,6		267
-Globulin	16,2		3,2 (1:1)	0,22	1,0 ⁺	0,8		114, 265
-Globulin	14,57		5,2	0,62	2,8	1,8	0	107, 269
			4,5 (1:2)	0,70	2,7 ⁺	1,7	0	191
-Globulin	15,64	97	1,2 (1:2)	0,29	4,4	1,3		269
			1,29 (1:2)	0,20	1,4 ⁺⁺	0,22	0	191
					1,3	0,30		269

⁺ Hexosamine
⁺⁺ Glucosamin

Es geht daraus hervor, daß die Alpha-, Beta- und Gammaglobuline noch in viele Unterfraktionen aufgeteilt sind, und daß etwa Lipo- und Glykoproteine nicht geschlossen bei einer Fraktion vorkommen, sondern fast im ganzen Serumfraktionspektrum vorkommen. Der Tabelle 2 entnimmt man auch, daß die meisten Serumproteine einen Kohlehydratanteil besitzen, wobei aber proteingebundene Glukose nicht gefunden werden konnte (11).

Über die spezifischen Funktionen der Globuline ist noch wenig bekannt. Lediglich die Gammaglobuline mit ihren Antikörperwirkungen sind relativ gut erforscht. Die Lipoproteine scheinen in erster Linie die Lipide, fettlösliche Vitamine und Hormone zu transportieren (12).

a1-Lipoproteine transportieren wichtiges Lipidmaterial für den Intermediärstoffwechsel in die Peripherie aus der Leber. Unter pathologischen Bedingungen verändern sich vorwiegend die a2- und b-Lipoproteine. Dem Coeruloplasmin aus der a2-Globulinfraktion wird eine Kupfertransportaufgabe zugesprochen. Das Transferrin aus der b-Globulinfraktion ist für die Bindung und den Transport des jonalen Eisens im Plasma verantwortlich.

PROBLEMSTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Da es bei den verschiedensten Erkrankungen mit deutlich gestörter Fettsynthese auch zu einer Dysproteinämie kommt, ist es von Interesse, ob die quantitativ untereinander veränderten Proteinfractionen einen Einfluß auf die Fettsäuresynthese ausüben. Dabei sollen bovine und humane Proteine verglichen werden, da sich aus den chemischen Unterschieden (Artspezifität) vielleicht auch Wirkungsunterschiede ergeben.

Nachdem im Isotopenlabor der Universitäts-Poliklinik schon viele Versuche über die die Fettsäure- und Cholesterinsynthese limitierenden oder hemmenden Faktoren gemacht wurden, scheint es von Interesse, nachdem Röder (13) bei Testung von Rinderglobulinen die stärkste Hemmwirkung auf die Fettsynthese durch die a-Globulinfraktion feststellen konnte, ob diese Ergebnisse auch bei Prüfung mit humanen Proteinen bestätigt werden können; ist doch gerade bei Eiweißforschungen die Aussage aus dem Tierexperiment besonders problematisch wegen der Art-, Organ- und sogar "Individual"-Spezifität dieser Stoffklasse. Deshalb sollen in dieser Arbeit humane und bovine a- und b-Globuline daraufhin untersucht werden, in wie weit sie in der Lage sind, den Einbau von radioaktiven C^{14} -Acetat in höhere Fettsäuren in einem wasserlöslichen Enzymsystem aus Taubenlebern zu hemmen. Die Erkenntnisse über dieses für die Fettsynthese

in vitro so wichtige Enzymsystem bzw. die entscheidenden Faktoren verdanken wir im wesentlichen den Arbeiten von Wakil, Masoro, Brady, Gurin, Gibson u. a. (14, 3, 15, 16).

Von V. v. Brand und W. Seitz wurde ein besonders hitzestabiler Faktor mit hoher fördernder Wirkung eingehend untersucht (17).

Neben den humanen Globulinen sollen die bovinen Globuline auf ihren Einfluß untersucht und einem kritischen Vergleich unterzogen werden. Die g-Globuline können schon deshalb unberücksichtigt bleiben, weil ihnen fast ausschließlich immunologische Funktionen zukommen.

M E T H O D I K

Acetat kann in vitro zu höheren Fettsäuren synthetisiert werden, wenn ein ausreichendes Enzymsystem zur Verfügung steht. Junge, gesunde, ausreichend ernährte Tauben besitzen in ihren Lebern die nötigen Fermente für Fettsynthese, Glykolyse und Atmung. Nach den Angaben von Brady und Gurin (16) erfolgte die Aufarbeitung der Taubenlebern.

DARSTELLUNG DES ENZYMSYSTEMS

Drei bis fünf Tauben im Alter von 6-9 Monaten, welche zuvor reichlich mit Weizen gefüttert waren, wird sofort nach dem Schlachten (Decapitieren mittels Schere) die Leber entnommen. Die Lebern werden sofort in Eiswasser gelegt; sodann werden sie von Blutkoageln und Bindegewebe befreit. Ergab sich bei der Leberinspektion in Farbe, Form oder Größe eine Abweichung von der Norm, oder zeigte ein Parenchymschnitt makroskopisch pathologische Veränderungen, oder fand sich bei der Palpation eine Konsistenzanomalie, so wurden solche Lebern verworfen. Oft wies schon ein abnormes Verhalten oder Aussehen der Tiere (z. B. Apathie, schlechter Allgemeinzustand, Schnabelhiebwunden) auf eine Erkrankung dieser hin. Ihre Leber, als zentrales Stoffwechselorgan meist geschädigt, bestätigte dann in vielen Fällen die schon vermutete Erkrankung der Tiere. Das gesunde Leberparenchym wird zerkleinert und gewogen. Die günstigste Menge für 11 Versuchsansätze liegt bei 30 g. Nach dem Wiegen ver-

setzten wir die Leber mit der 1, 2-fachen Menge eines Phosphat-Hydrogen-carbonat-Puffers von folgender Zusammensetzung:

0,009 m $\text{K H}_2\text{PO}_4$, 0,085 m K_2HPO_4 , 0,07 m KHCO_3 zu gleichen Teilen; $\text{p}_\text{H} = 7,4$.

Zur Zerstörung der interstitiellen Bindegewebssepten und der Zellwände wird das Leber-Puffergemisch im Potter-Elvehjem-Apparat homogenisiert. Zur Schonung des temperaturempfindlichen Fermentsystems wurden alle Manipulationen bei 0° Celsius ausgeführt. Das Homogenat wurde zur Entfernung der Zellstrukturen einer Zentrifuge zuerst 45 Min bei 2000 Umdrehungen pro Min ausgesetzt, der resultierende Überstand (supernatand fluid = sup) mit o. a. Puffer auf das 1,33-fache Lebergewicht aufgefüllt und weitere 75 Min bei 25000 Umdrehungen pro Min zentrifugiert, was einen Überstand ergibt, welcher nur noch Fermente, Mitochondrien und Mikrosomen enthält. Für eine Sedimentation der Mikrosomen und Mitochondrien (100 000 U/Min) wäre eine Ultrazentrifuge, die uns nicht zur Verfügung stand, erforderlich gewesen.

INKUBATION

Im Inkubator nach Warburg erfolgt in vitro die Synthese der Fettsäuren. Dazu werden in die Warburggrundkölbchen (ein Kölbchen = ein Versuchsansatz) außer dem Sup = 2,3 ml noch folgende konstante Substanzen einpipettiert:

Mg Cl_2 0,1 ml = 0,006 molare Endkonzentration

Na - Citrat 0,1 ml = 0,01 " "

C^{14} - Na - Acetat 0,4 ml = 0,008 " "

Ferner die nichtkonstanten Zusätze: die zu testende Substanz, in dieser Arbeit alpha und beta Globulin als Reinsubstanz von Mensch und Rind. Außerdem Aqua dest. oder Puffer zum Ausgleich der Volumendifferenz, da das Gesamtvolumen eines jeden Ansatzes konstant sein soll (Gesamtvolumen = 3 ml). Die Kölbchen wurden verschlossen 4 Stunden bei 38° Celsius + 0,1 °C unter ständigem Schütteln im Warburgapparat incubiert.

ISOLIERUNG DER SYNTHETISIERTEN FETTSÄUREN

Der Inhalt des Warburgkölbchens wurde mit 7 ml aqua bidest. in ein Schliffkölbchen übergespült und mit 25 mg Palmitinsäure als Trägersubstanz und mit 5 ml 30%igem KOH unter leichtem Sieden mit Rückflußkühler in 4 Stunden verseift. Nach der Verseifung wurde der Rückflußkühler mit Petroläther durchgespült und dann der abgekühlte Inhalt des Schliffkölbchens mit Petroläther in einen Scheidetrichter überführt. Nach Zusatz von 5 Tropfen Bromkresyl - Methylorange - Indikator und Ansäuerung mit 18 % HCl bis zum Umschlag des Indikators wurden die Fettsäuren durch 4-maliges Ausschütteln mit Petroläther extrahiert. Diese Auszüge -in Bechergläser eingebracht- wurden über einem Wasserbad vorsichtig eingedampft.

MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT DER SYNTHETISIERTEN FETTSÄUREN

Der Rückstand wird mit Petroläther gelöst und in einem Messkölbchen auf 10 ml aufgefüllt. 1 ml dieses die Fettsäuren enthaltenden Petrolätherauszuges wurde auf ein mit "lenspaper" belegtes Aluminiumplättchen ($\varnothing$ 3 cm) aufgetropft und luftgetrocknet. Von jedem Versuchsansatz wurden 4 Plättchen gegossen, die Radioaktivität im Geiger-Müller-Zählrohr gemessen und das arithmetische Mittel aus den von den 4 Plättchen gefundenen Messwerten (Impulse pro Min) als Ergebnis gewertet. Die Anzahl der Impulse pro Min ist gleichbedeutend einem Zehntel des in höhere Fettsäuren eingebauten radioaktiven Kohlenstoffes. Von jeder Versuchsreihe wurde einem Ansatz keine hemmende oder fördernde Substanz beigelegt, um eine Ausgangsaktivität zu erreichen, welche im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen als 100 % angenommen wurde. Dieser Ansatz, auf den die übrigen bezogen werden, entspricht der fettsäuresynthetisierenden Fähigkeit des verwendeten Enzymsystems. Um objektivere Meßergebnisse zu erhalten, haben wir eine C^{14} -Standard-Folie und ein Leerplättchen mitgemessen. Die Meßergebnisse der Leerplättchen können bei schlechter Reinigung und der Meßwert der Standard-Folie bei Schwankungen des Apparates (z. B. Änderung im Stromnetz) erheblich von der Norm abweichen, weshalb unter Umständen Korrekturberechnungen erforderlich sind.

Wie bei allen experimentellen Arbeiten, so muß auch hier eine bestimmte Fehlergrenze, bedingt durch technische Mängel und durch die Vielzahl der Arbeitsgänge, angenommen werden. Trotzdem dürfte die Fehlergrenze nach v. Brand kaum über 10 % liegen.

VERSUCHSTIERE

Wir verwendeten bei unseren Versuchen nur Normaltauben, das sind solche, die eine Ausgangsaktivität von über 2000 Imp/Min lieferten; lag sie darunter, dann handelte es sich um sog. Mangeltauben mit gestörtem Stoffwechsel und somit verminderter Fettsynthese meist infolge mangelnder Kohlehydraternährung. Da das Fermentsystem dieser Tauben, wie v. Brand zeigen konnte, intakt ist, müssen nichtfermentative Faktoren dabei eine wesentliche Rolle spielen (18).

VERSUCHSERGEBNISSE

1. Es werden zunächst die Ergebnisse entsprechend unseren Versuchsreihen im Isotopenlabor wiedergegeben, wobei hier der Übersicht wegen auf die nicht zu diesem Thema gehörenden mituntersuchten Substanzen sowie auf die Leerplättchen- und Folienwerte verzichtet wird.
2. Auf die vergleichende Darstellung der humanen a- und b-Globuline folgt die der bovinen a- und b-Globuline und endlich die uns wesentlich erscheinende Gegenüberstellung der humanen und bovinen a- bzw. b-Globuline.
3. Erst die Differenz der Ausgangsaktivität (= 100 %) und der daraus errechneten Prozentzahl des Versuchsansatzes mit Testsubstanz ergeben deren prozentuale Fettsäuresynthesehemmung.
4. Für die vergleichenden Untersuchungen wurde eine mittlere Konzentration von 30 mg Frischsubstanz gewählt, denn niedrigere Konzentrationen würden den Unterschied nicht so deutlich zum Ausdruck bringen.

I. Wirkung der humanen a-Globuline

Nr. des Versuchs	Leerversuch 2,0 Sup + 0,4 H ₂ O	= Ausgangs- aktivität	Zusatz von 30 mg humanen a-Glob. + Sup	Restaktivi- tät in %
1137	2890 Imp/min	= 100 %	1825 Imp/min	= 62 %
1138	1397 "	= 100 %	950 "	= 65,6 %
1140	897 "	= 100 %	793 "	= 87 %
1145	2082 "	= 100 %	1682 "	= 73,7 %
1147	2573 "	= 100 %	1973 "	= 76 %
1155	2347 "	= 100 %	1719 "	= 74 %

Durchschnittliche Restaktivität: $438,3 : 6 = 73 \%$
=====

Durchschnittliche Hemmung: $100 - 73 = 27 \%$
=====

II. Wirkung der humanen b-Globuline

Nr. des Versuchs	Leerversuch 2,0 Sup + 0,4 H ₂ O	= Ausgangs- aktivität	Zusatz von 30 mg humanen b-Glob. + Sup	Restaktivi- tät in %
1137	2890 Imp/min	= 100 %	1286 Imp/min	= 42,9 %
1147	2573 "	= 100 %	1840 "	= 70,8 %
1149	2165 "	= 100 %	2165 "	= 51,9 %
1153	2084 "	= 100 %	1113 "	= 51,2 %
1155	2347 "	= 100 %	1912 "	= 80,6 %

Durchschnittliche Restaktivität: $297,4 : 5 = 59,5 \%$
=====

Durchschnittliche Hemmung: $100 - 59,5 = 40,5 \%$
=====

III. Wirkung der bovinen a-Globuline

Nr. des Versuchs	Leerversuch 2,0 Sup+0,4 H ₂ O	Ausgangs- aktivität	Zusatz von 30 mg bovinen a-Glob. + Sup	Restakti- vität in %
1117	3724 Imp/min	= 100 %	1425 Imp/min	= 37,2 %
1118	1306 "	= 100 %	349 "	= 11,2 %
1136	2331 "	= 100 %	980 "	= 33,6 %
1138	1397 "	= 100 %	783 "	= 53 %
1140	897 "	= 100 %	402 "	= 38,5 %
1145	2082 "	= 100 %	699 "	= 27,4 %
1147	2573 "	= 100 %	937 "	= 34,2 %
1151	2810 "	= 100 %	1364 "	= 46,6 %
1155	2347 "	= 100 %	736 "	= 28,1 %

Durchschnittliche Restaktivität: $309,8:9 = 34,4\%$
=====

Durchschnittliche Hemmung: $100 - 34,4 = 65,6\%$
=====

IV. Wirkung der bovinen b-Globuline

Nr. des Versuchs	Leerversuch 2,0 Sup + 0,4 H ₂ O	Ausgangs- aktivität	Zusatz von 30 mg bovinen b-Glob. + Sup	Restakti- vität in %
1145	2082 Imp/min	= 100 %	1166 Imp/min	= 51,9 %
1147	2573 "	= 100 %	2221 "	= 85,9 %
1149	2165 "	= 100 %	1557 "	= 71 %
1153	2084 "	= 100 %	1400 "	= 66 %
1155	2347 "	= 100 %	1559 "	= 6,5 %

Durchschnittliche Restaktivität: $337,8:5 = 67,5\%$
=====

Durchschnittliche Hemmung: $100 - 67,5 = 32,5\%$
=====

Humane α - und β -Globuline und ihr Einfluß auf die Fettsäuresynthese

Wie Abb. 1 zeigt, ist die Hemmung der humanen β -Globuline mit 40,5 % und 13,5 % stärker als die der humanen α -Globuline mit 27 %.

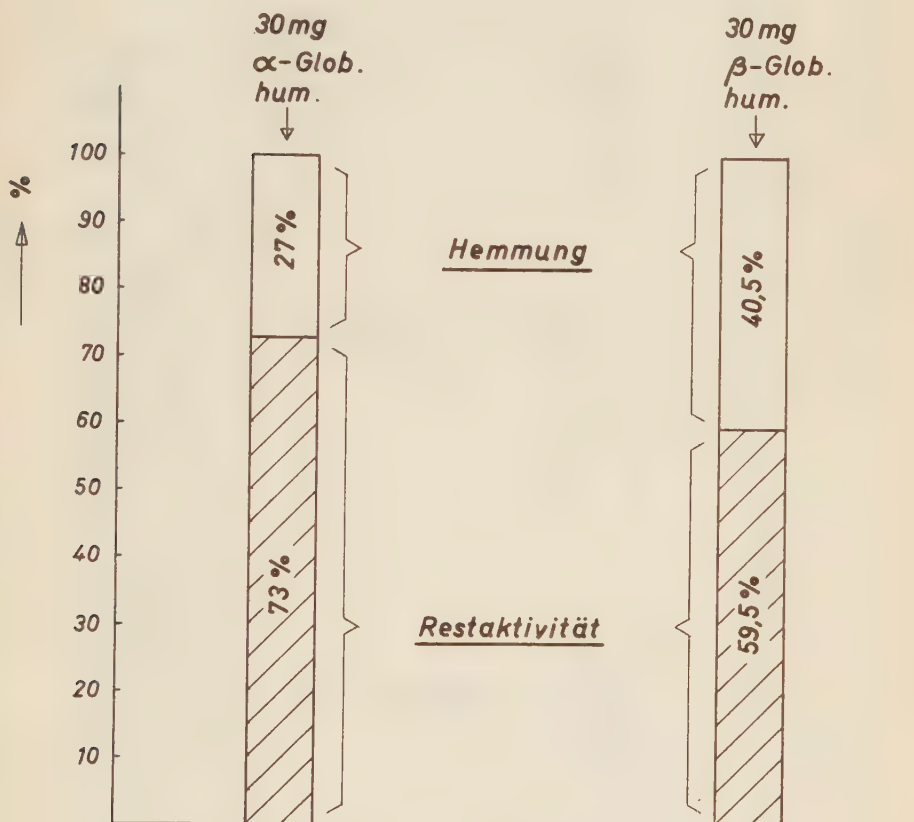


ABBILDUNG 1

Bovine α - und β -Globuline und ihr Einfluß auf die Fettsäuresynthese

Bei einem Vergleich der bovinen α - und β -Globuline ist die Hemmung der α -Globuline um 33,1 % stärker als die der β -Globuline. Hier zeigt sich auch, daß die bovinen α -Globuline von den untersuchten Globulinen mit 65,6 % die stärkste Hemmung überhaupt aufweisen.

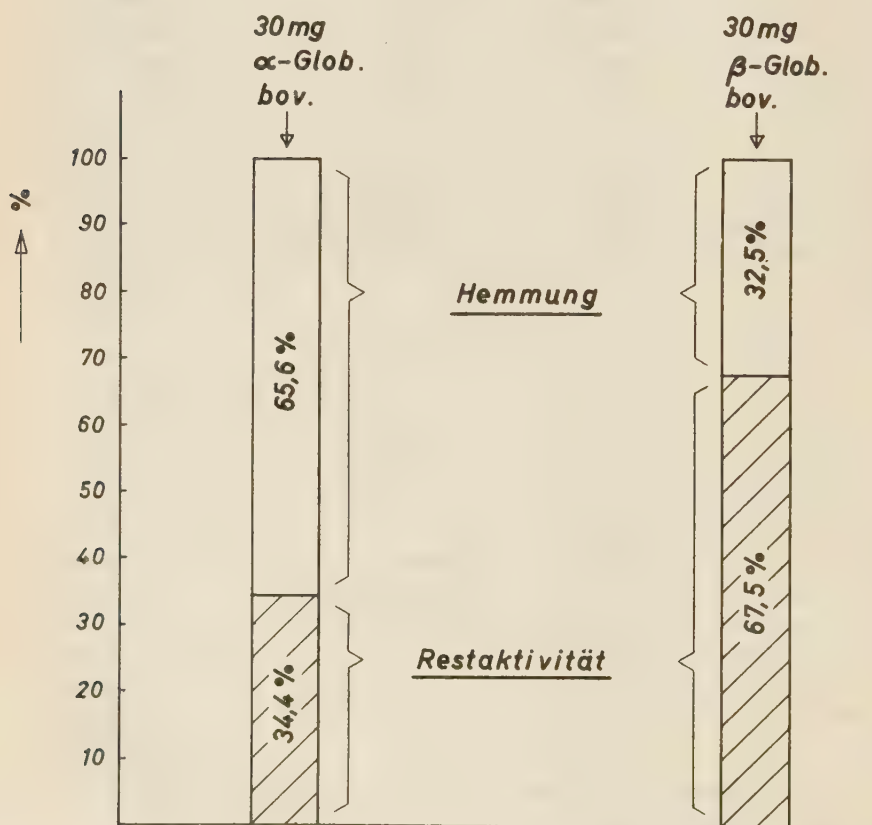


ABBILDUNG 2

Humane und bovine α -Globuline und ihr Einfluß auf die Fettsäuresynthese

In Abb. 3 wird nun erstmals die hemmende Wirkung von Eiweißfraktionen verschiedener Spezies verglichen, wobei sich das humane α -Globulin um 38,4 % geringer hemmungsaktiv zeigt als das bovine α -Globulin.

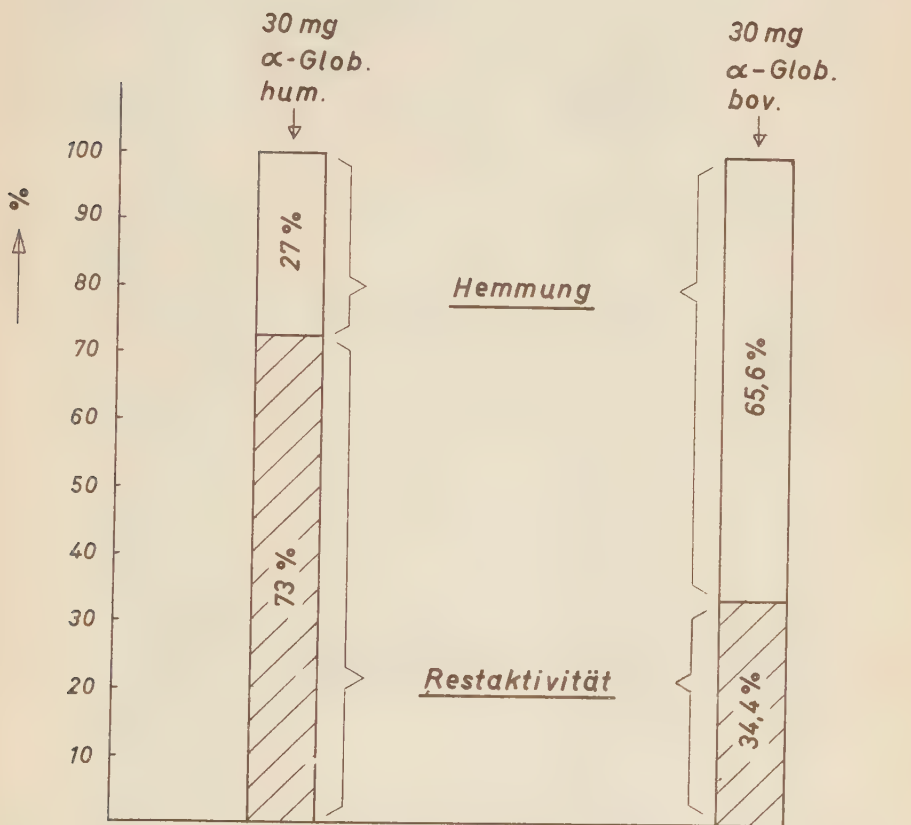


ABBILDUNG 3

Humane und bovine β -Globuline und ihr Einfluß auf die Fettsäuresynthese

Bei den β -Globulinen von Mensch und Rind haben die humanen Globuline eine stärkere Hemmung, wenn gleich die bovinen β -Globuline mit 32,5 % gegenüber den 40,5 % der humanen β -Globuline einen nicht viel weniger hemmenden Einfluß ausüben.

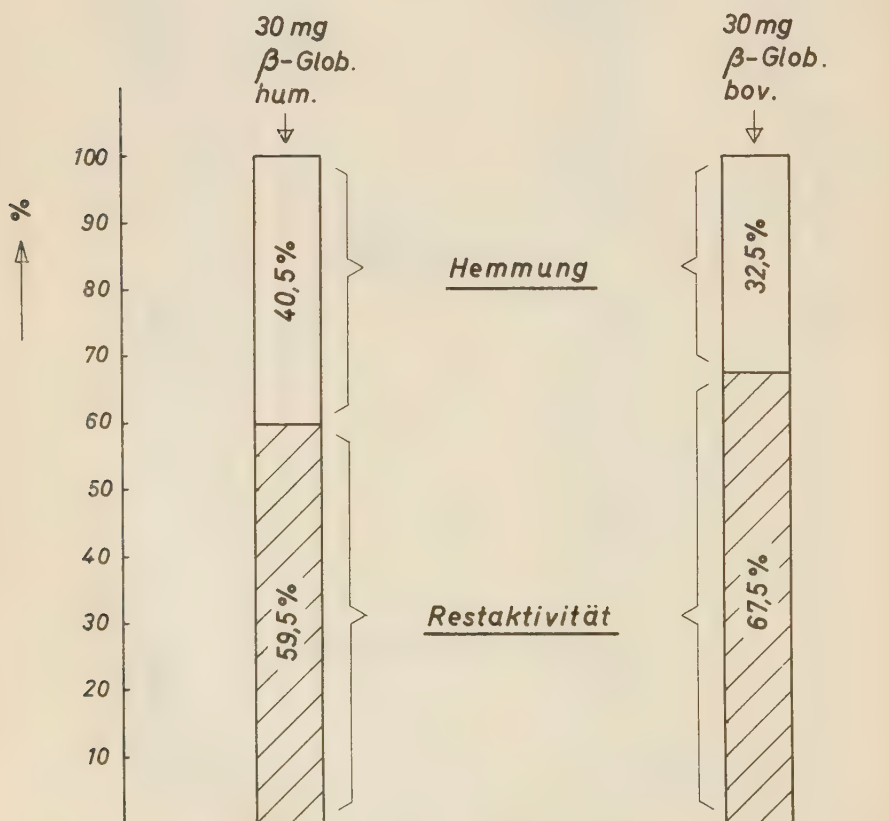


ABBILDUNG 4

Prozentuale Synthese- und Hemmung der humanen α - und β -Globuline und der bovinen α - und β -Globuline

Abb. 5 soll nochmal in anschaulicherer Darstellung das unterschiedliche Verhältnis der humanen und bovinen α - und β -Globuline wiedergeben.

So sehen wir deutlich die starke Hemmung der α -Globuline auf der bovinen Seite und das stärkere Hemmungsvermögen der β -Globuline auf der humanen Seite.

Die Prozentzahlen geben hier nicht die Ausgangs- bzw. Restaktivität, sondern nur die prozentuale Hemmung wieder.

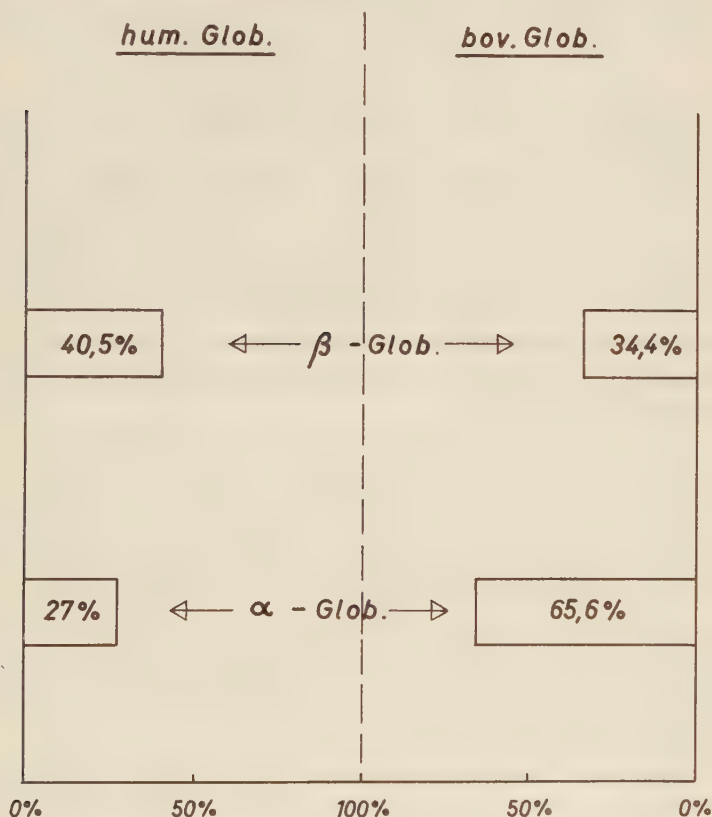


ABBILDUNG 5

DISKUSSION

Der Einfluß der a- und b-Globuline vom Rind auf die Fettsäuresynthese war schon in früheren Arbeiten (13) untersucht worden und konnte hier auch bestätigt werden. Nun sollten auch die Eiweißfraktionen vom Menschen auf ihre Wirkung geprüft werden, kommt es doch darauf an, bereits aus Tierexperimenten für die Humanmedizin gewonnene Erkenntnisse durch adäquate Experimente zu sichern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings einen Unterschied, der aber bei der in der Einleitung erwähnten Artspezifität der Eiweißstoffe nicht erstaunen darf.

War die Hemmung durch a-Globulin vom Rind mit 65,6 % sehr groß, so fanden wir bei der entsprechenden Eiweißfraktion vom Menschen diese nur gering, dafür konnten jedoch die humanen b-Globuline mit 40,5 % eine entsprechende Hemmung erzielen, was bei den bovinen b-Globulinen nicht der Fall war. Da wir weder genau den Angriffspunkt der Eiweiße bei der Fettsynthese kennen, noch aber genau die entscheidende Unterfraktion — a- und b-Globuline sind ja Eiweißkonglomerate — in ihrer chem.-physik. Wirkung kennen, beginnt hier die Hypothese und die Diskussion.

Für den Unterschied der Ergebnisse der Eiweißversuche an Mensch und Tier können folgende Tatsachen in Frage kommen:

- a) die unterschiedliche Primärstruktur, wie einleitend schon am Beispiel der bovinen und humanen Albumine gezeigt wurde, ferner die dazugehörigen Sekundär- und Tertiärstrukturen mit ihren spezifischen Funktionen,
- b) a- und b-Globuline sind Konglomerate von Proteiden verschiedenster Zusammensetzung, wie die Tabelle 2 für Humanglobuline zeigt; und ihr Eiweißspektrum ist sicher weder quantitativ noch qualitativ mit dem Spektrum der Rindereiweiße identisch.

Wie stark eine Unterfraktion allein hemmend wirksam sein kann, zeigt allein unser experimenteller Versuch mit Zugabe von 2 mg a₂-Makroglobulin, wobei eine Hemmung mit 50 % erreicht wurde (19).

Wenn wir abschließend noch diskutieren wollen, wie die Serumglobuline möglicherweise die Fettsynthese beeinflussen, so muß an erster Stelle an eine mögliche Fermentblockade der für die Fettsynthese wichtigen Enzyme und da be-

sonders an das Coenzym-A gedacht werden. In welcher Form -sei es durch Inaktivierung der aktiven Fermentgruppe oder selbst als Fermente eingreifend- das geschieht, ist noch nicht bekannt; feststeht jedenfalls, daß bei vielen konsumierenden Erkrankungen, bei denen also die Fettsynthese unterdrückt ist, sich eine Dysproteinämie findet, die die a- und b-Globuline bevorzugt betrifft.

Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß sie an der Steuerung des Fettab- bzw. -aufbaues maßgeblich beteiligt sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

- 1.) Es wurde die prozentuale Hemmung der Fettsäuresynthese durch a- und b-Globuline von Mensch und Rind festgestellt, wobei bei einer Zusatzmenge von 30 mg die bovinen a-Globuline die stärkste Hemmwirkung zeigten.
- 2.) Bei der Untersuchung der humanen a- und b-Globuline zeigte sich eine stärkere Hemmwirkung der humanen b-Globuline.
- 3.) Ein umgekehrtes Verhalten zeigten die bovinen Globuline, wobei die bovinen a-Globuline wesentlich stärker hemmen als die bovinen b-Globuline.
- 4.) Bei dem Vergleich der a-Globuline zwischen Mensch und Rind lag die Hemmung der bovinen a-Globuline wesentlich über der der humanen a-Globuline.
- 5.) Die humanen b-Globuline wurden dagegen mit einer etwas stärkeren Hemmwirkung als die bovinen b-Globuline gefunden.
- 6.) Es ergibt sich also eine starke bovine a-Globulin-Hemmwirkung auf die Fettsäuresynthese bei wesentlich schwächerer Hemmung durch bovine b-Globuline, während die humanen a-Globuline relativ wenig hemmen bei etwas stärkerem hemmenden Einfluß der humanen b-Globuline.
7. Die Ergebnisse wurden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) S. Numa, Matsubishi, F. Lynen Biochem. Zeitschrift, 334/202 (1961)
- 2.) F. Lynen Zschr. Ausgew. Chemie, 67, 463 (1955)
- 3.) V. v. Brand und E. Helmreich Biochem. Zschr., 328, 146 (1956)
- 4.) J. van Baalen and S. Gurin J. Biol. Chem. Vol., 205, 303 (1953)
- 5.) F. Leuthardt Lehrbuch d. phys. Chemie, 15. Aufl., (1963)
- 6.) R. Steele The formation of amino acids from carbohydrate carbon in the mouse, biol. Chem., 198, 237 (1952)
- 7.) H. E. Schultze Plasma-Protein-Forschung im Zeichen des Eiweißstrukturproblems. Verh. dtsch. Ges. in Med., 66, 225 (1960)
- 8.) L. Pauling The configuration of polypeptide chains in proteins. Conseil de Chimie 9, 63 (1953)
- 9.) J. C. Kendrew u. a. Structure of myoglobin-Nature (London) 185, 422 (1960)
- 10.) M. Burstein Les lipoproteines du plasma humain. Bull. Schweiz. Akad. med. wiss. 17, 92 (1961)
 und
 F. A. Pezold Die Lipoproteide im Blutplasma, Springer, Berlin, Göttingen (Heidelberg 1961)
- 11.) H. E. Schultze Glykoproteine, Dtsch. med. Wschr., 83, 1742 (1958)
- 12.) H. E. Schultze und K. Heide Der neueste Stand der Plasmaproteinforschung. Med. Grundlagenforschung Band III, Thieme, Stuttgart (1960)

- | | |
|---|--|
| 13.) K.Röder | Der Einfluß von Blutseren und Serumweiß-
fraktionen auf den Einbau von C^{14} -Acetat
in Fettsäuren bei einem Enzymsystem aus
Taubenleber, Inauguraldissertation,
München (1964) |
| 14.) S.I. Wakil and I. Ganguly | Fed. Proc., 18, 346 (1959) |
| 15.) D.M. Gibson, E.B. Titchener,
S.I. Wakil | Biochem. et Biophys. Acta, 30, 376 (1958) |
| 16.) R.O. Brady and S. Gurin | J. Biol. Chem., 199, 421 (1952) |
| 17.) V.v.Brand und W.Seitz | Naturw., 36, 98 (1958) |
| 18.) V.v.Brand und W.Seitz | Klin. Wschr., 36, 87 (1958) |
| 19.) V.Nagengast-v.Brand
und W.Seitz | Klin. Wschr., 43.Jahrg., 7.Heft,
April 1965, S.402 |

Herrn Prof. Dr. W. SEITZ danke ich ergebenst für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik und die Überlassung des Themas.

GroßenDankschulde ich vor allem Frau Dr. Dr. Vera von Brand-Nagengast für die wertvollen Anregungen sowie für die Korrektur der Arbeit.

Fräulein cand. med. Dorothea Günther und Fräulein Heidi Wilde gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 17. 8. 36 wurde ich, Günter, Erich, Edwin Pohle, in Düsseldorf als Sohn des Facharztes für Augenheilkunde Dr. med. Hans Pohle und seiner Ehefrau Margot Pohle, geb. Entress, geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Seebruck a./Chiemsee, in Düsseldorf das Städtische Neusprachliche Gymnasium Gerresheim, wo ich im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Nach vorklinischen Studiensemestern in Tübingen und Kiel, besuchte ich die Universitätskliniken in Graz und München.

1959 bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Kiel und 1962 das Staatsexamen in München.

Nach zweijähriger Tätigkeit als Medizinalassistent in München, Wolfratshausen und Bad Tölz, war ich noch ein Jahr als chirurgischer Vollassistent in Bad Tölz beschäftigt.

Seit 1. Juli 1965 bin ich zur Facharztausbildung an der Universitäts-Augenklinik München.

